

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

INTRACELLULAR MOONLIGHTING PROTEINS ON THE CELL SURFACE

**RAD “NA CRNO” UNUTARSTANIČNIH PROTEINA NA STANIČNOJ
POVRŠINI**

SEMINARSKI RAD

Kristina Funtak

Preddiplomski studij molekularne biologije

Undergraduate study of molecular biology

Mentor: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	3
2. FUNKCIJE <i>MOONLIGHTING</i> PROTEINA NA STANIČNOJ POVRŠINI.....	4
2.1 Unutarstanične funkcije.....	4
2.2 Izvanstanične funkcije.....	4
2.2.1 <i>Moonlighting</i> proteini na staničnoj površini u ulozi receptora za plazminogen.....	5
2.2.2 Fosfoglukoza izomeraza.....	5
2.2.3 Translacijski faktor u elongaciji Tuf.....	6
3. FIZIKALNA SVOJSTVA <i>MOONLIGHTING</i> PROTEINA NA STANIČNOJ POVRŠINI.....	7
3.1 Intrinzično nestrukturirani proteini u ulozi <i>moonlighting</i> proteina na staničnoj površini..	8
4. BIOINFORMATIKA I <i>MOONLIGHTING</i> PROTEINI.....	9
5. EVOLUCIJA.....	10
5.1 Duplikacija gena.....	10
6. ZAKLJUČAK	13
7. LITERATURA.....	14
8. SAŽETAK.....	15
9. SUMMARY.....	15

1. UVOD

Znanstvenici George Beadle i Edward Tatum su 1940. godine postavili hipotezu "jedan gen - jedan protein" (eng. *one gene – one protein*) koja je dugo vremena bila neosporiva te povezana s asocijacijom da svaki protein ima jednu funkciju. Krajem 20. stoljeća otkriveno je mnogo proteina koji se ne slažu s postavljenom hipotezom. Naime, uočeno je da postoje proteini koji su kodirani jednim genom, a obavljaju više funkcija u ili izvan stanice. Takve proteine nazivamo *moonlighting* proteini, MP (Lehninger, Nelson i Cox, 2013).

Moonlighting proteini obuhvaćaju podskupinu multifunkcionalnih proteina gdje jedan polipeptidni lanac izvodi dvije ili više biokemijskih ili biofizičkih funkcija, koji nisu nastali uslijed genskih fuzija, alternativnog prekrajanja, višestrukih proteolitičkih fragmenata s više funkcija ili zbog promiskuitetne enzimske aktivnosti (Jeffery, 1999). Većina poznatih *moonlighting* proteina su citosolni enzimi, šaperoni, citokini, komponente staničnog skeleta, adhezini itd. (Jeffery, 2015).

MP imaju različite metode izmjenjivanja funkcija. Mogu se izlučivati u izvanstanični matriks, interagirati s molekulama DNA ili RNA, mijenjati funkciju zbog utjecaja temperature, redoks stanja stanice, promjena u oligomerskom stanju, interakcijama s drugim polipeptidnim lancima, i kompleksima, u interakciji s membranom, ovisno o koncentraciji liganda, supstrata, kofaktora ili produkta (Jeffery, 2009). Klasični primjeri MP-a su topljivi enzimi koji vezanjem na molekule DNA ili RNA sudjeluju u regulaciji transkripcije ili translacije. Drugi tip MP-a kojima je sekundarna funkcija strukturna su proteini u leći oka, kristalini (Piatigorsky i Wistow, 1987; Piatigorsky i Wistow, 1989).

Do sada su MP-ovi identificirani slučajno prilikom analiza membranskih proteina. Problem je predstavljao manjak predikcijskih algoritama na temelju kojih bi se moglo doći do novih saznanja o MP-ovima. Za *moonlighting* proteine na staničnoj membrani. (eng. *moonlighting proteins on the cell surface*, MPCS), je u većini slučajeva određena unutarstanična, primarna funkcija, a tek kasnije je nađena sekundarna, izvanstanična funkcija.

MP su nađeni u sisavaca, kvasaca, crva, bakterija, biljaka, virusa, arheja, i u mnogim drugim organizmima. Baza *MoonProt Database* sadrži trenutno preko 300 zabilježenih *moonlighting* proteina, a vjerojatno je da postoji još mnogo proteina koji nisu dosad istraženi. (Espinosa-Cantú i sur., 2015)

2. FUNKCIJE *MOONLIGHTING* PROTEINA NA STANIČNOJ POVRŠINI

Kako je već spomenuto eksperimentima u proteomici se vrlo često nailazi na unutarstanične proteine na membrani. Istraživanje MP-a i ostalih proteina može biti veoma otežano jer se mogu dobiti lažni pozitivni rezultati, poput izmijenjenih obrasca ekspresije ili vezanja na druge proteine (Jeffery, 2009).

MPCS su otkriveni u arhejama (*Methanocaldococcus jannashii*, *Sulfolobus tokodaii*, *Thermoplasma acidophilum*, etc.), te patogenim (*Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus*, etc.) i probiotičkim bakterijama (*Bifidobacterium*). Tipovi bakterija uključuju koki, mikobakterije, mikoplazme, i spirohete. U eukariota su nađeni u sisavcima, placentalnim i monotremata, gmazovima, vodozemcima, ribama, crvima, kukcima, biljkama, gljivama, i u protozoa. Čak su nađeni i u virusima (Jeffery, 2014).

Za neke MPCS-ove u patogenim bakterijama, protozoa i gljivama pokazano je kako im je glavna izvanstanična funkcija omogućavanje infekcije ili virulencije. Kod simbionata MPCS-ovi služe u interakcijama s domaćinom. Za uspješnu kolonizaciju bakterija nužno je imati mehanizme adhezije za stanice domaćina. Upravo je za MPCS pokazano da većina sudjeluje u interakcijama s izvanstaničnim proteinima ili direktno sa stanicama domaćina (Amblee i Jeffery, 2015).

2.1 Unutarstanične funkcije

Za većinu MPCS-a utvrđene su metaboličke funkcije te prema internacionalnoj klasifikaciji enzima najviše su zastupljeni u klasi 1, oksidoreduktaze, i u klasi 2, transferaze. Sudjeluju u metaboličnim putevima, uključujući glikolizu, ciklus limunske kiseline, put pentoza fosfata, metabolizam nukleinskih kiselina ili nukleotida. Od ostalih proteina su zastupljeni šaperoni (protein Hsp60/GroEL, protein Hsp 70/DnaK), translacijski proteini (elongacijski faktor Tu, Ef-Tu), transkripcijski elongacijski faktori, protein tiol specifični antioksidans i histoni (Amblee i Jeffery, 2015).

2.2 Izvanstanične funkcije

Na staničnoj membrani MPCS sudjeluju u vezanju izvanstaničnog matriksa, djeluju kao adhezini kako bi se prihvatili na stanicu domaćina ili kao stanični receptori za topljive proteine. Neki od MPCS-a koji služe kao adhezini na staničnoj membrani su fruktoza-1,6-bisfosfat aldolaza, gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (eng. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH),

Hsp60/GroEL, piruvat-feredoksin oksidoreduktaza kao i mnogi drugi. Potrebno je još dodatno istražiti proteine na stanicama domaćina kako bi se utvrdilo točno koji proteini se vežu na MPCS-ove u ulozi adhezina. Identificirano je da se protein GAPDH iz bakterije *Streptococcus pyogenes* veže za receptor uPAR/CD87 na ljudskim stanicama. Šaperon Hsp60/GroEL iz bakterije *Haemophilus ducreyi* se veže na glikosfingolipide, a na površini bakterije *Listeria monocytogenes*, alkohol acetaldehid dehidrogenaza se veže na drugi *moonlighting* protein Hsp60.

Fibronektin, laminin, kolagen ili mucin su samo od nekih strukturnih komponenti domaćina na koje se vežu bakterijski MPCS. Interakcijama s MPCS-ovima se održavaju stabilne fizičke veze nužne za patogenost ili održavanje simbioze. Primjer simbioze su bakterija *Lactococcus lactis* i kvasac. Proteini, bakterije *L. lactis*, Hsp60/GroEL, DnaK/Hsp70, GAPDH, piruvat kinaza i 6-fosfofruktokinaza se vežu na kvašćevu invertazu i tako omogućavaju simbiozu (Amblee i Jeffery, 2015).

2.2.1 Moonlighting proteini na staničnoj površini u ulozi receptora za plazminogen

Bakterijama je invazija na stanice domaćina olakšana vezanjem na topljivi protein plazminogen. Plazminogen je prekursor plazmina, serinske proteaze prisutne u krvi koja pomaže u cijepanju fibrinskih ugrušaka. Vezanjem na plazminogen dolazi do konverzije u plazmin koji ostaje vezan na bakteriji. Tako proteaza ostaje vezana na bakteriju čime se omogućava degradacija izvanstaničnog matriksa ili bazalnih membrana čime dolazi do migracije kroz tkiva (Jeffery, 2014).

Domene MPCS-a koje vežu plazminogen su kratke sekvence lizina, uobičajeno na C-terminalnom dijelu proteina (u nekih enolaza se nalaze u unutrašnjoj strukturi). Dodavanje lizina na C-terminalni kraj je primjer modifikacija koje ne utječu na prvotnu funkciju proteina, a pridonose evoluciji novih svojstava. Kako bismo dodatno razumjeli receptore za plazminogen potrebno je dodatno istražiti mogu li ti isti MPCS-ovi vezati i druge topljive proteine, i postoje li možda proteini koji u svojoj strukturi sadrže domene poput sekvenci s ponavljajućim lizinom i mogu li se adaptirati na drugu funkciju (Amblee i Jeffery, 2015).

2.2.2 Fosfoglukoza izomeraza

Fosfoglukoza izomeraza (eng. *phosphoglucose isomerase*, PGI) je citosolni enzim čija je uloga kataliza glukoza-6-fosfata u fruktoza-6-fosfat u glikolizi. Izlučivanjem izvan stanice obavlja još četiri dodatne funkcije. PGI djeluje kao neuroleukin, jedan od citokina koji je odgovoran za rast limfocita B i diferencijaciju i izlučivanje protutijela. To je citokin koji sudjeluje u metastaziranju

raka dojke. U ulozi živčanog faktora rasta pomaže u održavanju nekih embrionalnih spinalnih i osjetnih neurona. Također je otkriveno da kao PGI/neuroleukin sadrži istu funkciju kao autokrini faktor pokretljivosti (eng. *autocrine motility factor*) koji uzrokuje migraciju stanica. I naposljetku djeluje kao medijator diferencijacije i sazrijevanja što uzrokuje diferencijaciju ljudskih mijeloidnih leukocitnih stanica (Jeffery, 1999).

Za PGI je poznato da je konzerviran u 126 vrsta. Međutim vanjski, topljivi dijelovi proteina poput petlji, džepova i ostalih struktura nisu konzervirani što omogućava evoluciju bez gubljenja prvotne funkcije. Aktivno mjesto PGI-a se sastoji od petlji i helikalnih struktura koje uključuju razne dijelove proteina tako da se aktivno mjesto preklapa s domenom za vezanje proteina (Jeffery, 2014). U tom slučaju je vrlo jasno kako se i neke unutrašnje postojeće strukture mogu prenamijeniti u drugu funkciju bez narušavanja prvotne funkcije.

2.2.3 Translacijski faktor u elongaciji Tuf

U bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* translacijski faktor u elongaciji Tuf sadrži druge funkcije važne u invaziji imunosnog sustava domaćina i tkiva. Unutar stanice obavlja translacijsku ulogu, a na staničnoj membrani služi kao receptor za dva plazma proteina, faktor H i plazminogen. Faktor H je sastavnica serinske proteaze potrebne za degradaciju proteina komplementa C3b. Degradacijom komponente komplementa C3b dolazi do aktivacije C5-konvertaze klasičnog ili alternativnog puta, što na kraju dovodi do stvaranja kompleksa MAC (eng. *membrane attack complex*), kompleks koji napada membranu, a potreban je za lizu stanica (Andreis i sur., 2010). Na ovaj način bakterija *P. aeruginosa* već u prvom koraku vezanjem na faktor H sudjeluje u onemogućavanju aktivacije imunosnog sustava domaćina. Kako je sustav komplementa evolucijski stariji mehanizam obrane bakteriji to omogućuje širok spektar vrsta od kojih se može obraniti. Druga funkcija je vezanje na plazminogen koji se konvertira u aktivnu formu plazmin i omogućuje bakteriji invaziju i rasprostranjenje patogena (Jeffery, 2009). Na ovaj način translacijski faktor u elongaciji Tuf kao MPCS omogućuje kroz dvije funkcije brzo rasprostranjenje i kolonizaciju domaćina.

3. FIZIKALNA SVOJSTVA *MOONLIGHTING* PROTEINA NA STANIČNOJ POVRŠINI

Istraživanje fizikalnih svojstava MPCS-a je provedeno na 98 proteina, koji pripadaju u 30 različitih skupina. Većina istraživanih MPCS-a spada u bakterije (gram-pozitivne i gram-negativne) mikobakterije, spirohete i mikoplazme. Većina njih su patogene, neke su probiotičke bakterije ili dio crijevnog flore.

Uz pomoć javno dostupnih baza i bioinformatičkih programa prikupljene su sekvence proteina i 3D strukture. Na temelju uzetih podataka, seta proteina za koje je poznato da imaju sekundarnu funkciju, tražena su zajednička svojstva MPCS-a. Analizirane su signalne sekvence, molekularna težina, teoretska izoelektrična točka (pI), alifatski indeks, GRAVY vrijednost i trodimenzionalne strukture (Amblee i Jeffery, 2015).

Izvanstanični proteini s funkcijom na staničnoj membrani sadrže signalnu N-terminalnu regiju. U MPCS-a nisu nađene N-terminalne sekvence. Kako se radi o primarno citosolnim proteinima još uvijek su nejasni mehanizmi transporta preko membrane, izlučivanja i ugradnje u membranu. Primjerice, kod gram-pozitivnih bakterija nužan je motiv LPXTG kako bi se proteini ugradili u membranu (Amblee i Jeffery, 2015). Dakle, moguće je da se radi o novim transportnim sustavima koje dodatno treba istražiti. S obzirom na to da raste problem otpornosti bakterija na antibiotike, ciljanje mehanizama ugradnje i transporta MPCS-a bi moglo pružiti alternativna rješenja smanjivanja mogućnosti vezanja bakterija na domaćina i razvitak infekcija (Jeffery, 2015).

Uzeti su podaci srednjih duljina aminokiselinskih sljedova kako bi se odredilo odstupaju li MPCS-ovi od tih vrijednosti. Srednje duljine aminokiselinskih sljedova kod eukariota su 361 aminokiselina, a kod bakterija su 257 aminokiselina. Za MPCS-ove je uočeno da većina ima sekvencu značajno dulju od zabilježenih srednjih vrijednosti. Proteini s duljim sekvencama su stabilniji, stoga je moguće da su takvi proteini prenamijenjeni za MPCS-ove jer mogu izdržati dinamične uvjete na staničnoj membrani (Amblee i Jeffery, 2015).

Izoelektrična točka varira među proteinima u ovisnosti o njihovoj lokalizaciji u stanici. Proteini su najmanje topljivi blizu svojih pI-ova stoga se moraju nalaziti u okolišu optimalnog pH. Za MPCS je utvrđeno da im je pI oko 4.5-6.5 što je tipično za citosolne proteine.

Alifatski indeks ukazuje na termostabilnost proteina. Računa se kao relativni volumen koji je zaokupljen s alifatskim ograncima (Ala, Val, Ile i Leu). U citosolnim proteinima je alifatski indeks je 80-100, što se poklapa s dobivenim vrijednostima za MPCS-ove. Za par proteina su nađena odstupanja (histon H1, peroksisomalna katalaza CTZA1, hidrolaza žuči, glutamin sintaza, peroksiredoksin i superoksid dismutaza).

GRAVY vrijednost se računa kao suma vrijednosti hidropatije svih aminokiselina,

podijeljeno s brojem bočnih ostataka ukupnog broja aminokiselina. Pozitivne vrijednosti upućuju na više hidrofobnih/nepolarnih bočnih ograna, a negativne na više polarnih/ionskih bočnih ograna. MPSC imaju negativnu GRAVY vrijednost. Rezultati govore u prilog da se radi o topljivim proteinima koji nemaju hidrofobne sekvence za transmembranske regije.

Trodimenzijska struktura određuje stabilnost proteina i toleranciju na mutacije (supstitucije, adicije, delecije). Većina MPSC-ova je nađeno u 58 domena klasifikacije CATH. Najviše ih spada u klasu 3 (sadrže značajne količine alfa-heliksa i beta ploča u sekundarnoj strukturi), 13 ih je u klasi 1 (alfa heliksi) i 6 domena je u klasi 2 (beta ploče). Rezultati upućuju da se niti prema trodimenzijskoj strukturi ne razlikuju značajno od citosolnih proteina (Amblee i Jeffery, 2015).

Prema istraženim fizikalnim svojstvima MPSC odgovaraju tipičnim unutarstaničnim proteinima. Istraživanje je provedeno na proteinima koji su prisutni u metabolizmu ili se radi o šaperonima. Pretpostavlja se da su takvi proteini korišteni u evoluciji zbog njihove velike količine u stanici. S obzirom da se većinski radi o *housekeeping* proteinima, koji su prisutni kroz milijune godine evolucije, druga mogućnost je da su iskorišteni jer su pogodna meta za modificiranje i postizanje novih funkcija.

S dodatnim znanjima o MPSC-ovima, koje su im funkcije, u kojim biokemijskim putevima, multiproteinskim kompleksima ili signalnim putevima sudjeluju mogli bi predviđati proteinske funkcije iz studija komparativne ekspresije, protein-protein analiza, *knockout* genskih eksperimenata i ostalih proteomskih projekata (Jeffery, 2015).

3.1 Intrinzično nestrukturirani proteini u ulozi *moonlighting* proteina na staničnoj površini

Intrinzično nestrukturirani proteini (eng. *intrinsically unstructured proteins*, IUP) imaju manjak definirane trodimenzijske strukture u nativnom stanju. Intrinzično nestrukturirane regije (eng. *intrinsically disordered regions*, IDR) omogućavaju različita konformacijska stanja, pretpostavlja se da su otpornije na mutacije od strukturiranih domena i zato su moguća mjesta evoluiranja novih funkcija. Proteini IUP nađeni su u prijenosu signala, ekspresiji gena i šaperonima. Interakcije mogu ostvarivati preko svoje površine i ovisno o konformaciji se vezati na različite proteine i njihova različita vezna mjesta (Tompa, 2005; Jeffery, 2009). U histonu H1 su nađeni duži IDR-ovi, međutim prethodni rezultati istraživanih proteina ukazuju da MPSC-ovi ne sudjeluju u interakcijama s drugim proteinima na staničnoj površini (Amblee i Jeffery, 2015). S obzirom da IUP svojim konformacijskim promjenama mogu mijenjati funkcije i svojstva, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se potvrdio udio MP-a koji imaju IDR-ove.

4. BIOINFORMATIKA I *MOONLIGHTING* PROTEINI

S napretkom tehnologije sve su veće baze proteinskih sekvenci, ali i dalje postoji problem predviđanja MP-a. U istraživanjima se nove funkcije nalaze na temelju homolognosti. Problem s MP-ovima je što homolozi ne moraju nužno imati iste funkcije. Primjerice, akonitaza u sisavaca, u mitohondrijima i citoplazmi prevodi citrat u izocitrat. Međutim, samo citoplazmatska akonitaza ima sekundarnu funkciju vezanja na mRNA, dok mitohondrijska akonitaza pomaže u održavanju mtDNA (Jeffery, 2015). Drugi primjer su kristalini, pačji proteini delta1 i delta2 koji dijele 94% aminokiselinske sekvence i sličnu trodimenzionalnu strukturu. Samo protein delta2 ima sekundarnu funkciju arginosukcinat lijaze koja se ne nalazi u lećama (katalizira cijepanje arginosukcinata na arginin i fumarat) (Jeffery, 2009). Vrlo je jasno da se samo prema sekvenci homologa ne može dovoljno točno odrediti funkcija samog proteina.

Drugi problem je što se trenutno ne zna kako odrediti funkciju MP-a prema poznatoj sekvenci ili strukturi. Većina algoritama predviđa jednu funkciju proteina, dok su u testiranjima programi za predviđanje više funkcija (Jeffery, 2015).

Jedan od algoritama kojim se nastoji na genomskoj razini predvidjeti MP-ove koristeći širok spektar informacija o proteinima je MPFit. Algoritam MPFit je prvi računalni predikcijski model za automatsku identifikaciju MP-a. Za samu analizu MP-a je korištena genska ontologija, protein-protein interakcije, genska ekspresija, filogenetički profili, genetičke interakcije i mrežno bazirane grafike proteina za strukturna svojstva (uočavanje i IUP-a). MPFit radi na principu da može predvidjeti i one podatke kojih trenutno nema u bazama i na temelju toga predvidjeti MP-ove. Na temelju podataka genske ontologije MP se mogu predvidjeti s 98% točnošću. Koristeći samo svojstva dobivena "omnikama" MP se mogu identificirati sa 75% točnošću. Autori istraživanja su zatim primijenili metodu na genomima kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), oblića (*Caenorhabditis elegans*), i čovjeka (*Homo sapiens*) te je nađeno 2-10% potencijalnih MP-ova. Metoda još uvijek ima grešaka i neke predikcije nisu točne, ali i ovo je veliki korak nakon algoritama predviđanja jedne funkcije proteina (Khan i Kihara, 2016). Brzim razvojem bioinformatike mogli bismo preciznije i brže identificirati MP.

5. EVOLUCIJA

Prema fizikalnim svojstvima uviđamo da su MPCs-ovi slični citosolnim proteinima. Također se zna da je nova funkcija često na vanjskim predjelima proteina što im omogućuje interakciju s drugim proteinima. Modifikacije kratkih sekvenci su dovoljne za protein-protein interakcije. Kako je već i pokazano MPCs imaju nešto duže sekvence od ostalih unutarstaničnih proteina. Generalno su aktivna mjesta u unutrašnjoj strukturi, što omogućuje evoluciju vanjskih dijelova bez da se poremeti izvorna funkcija (Amblee i Jeffery, 2015).

Postavlja se pitanje kako je došlo do evolucije sekundarne funkcije? Kako se mijenjala proteinska struktura, regulacija, ekspresija proteina, aktivnost i mijenjanje između funkcija? U nekim slučajevima proteini su se adaptirali na nove funkcije bez puno fizikalnih promjena, ali u drugim slučajevima je bila potrebna značajna konformacijska promjena za primjerice stvaranje novih veznih mjesta. Nova saznanja o evoluciji, njihovoj strukturi i stvaranju novih veznih mjesta bi mogao biti novi korak u stvaranju stabilnih proteina, i njihovih temelja za dodavanje novih funkcija. Kako se u jednom proteinu kombinira više funkcija, otvaraju se nove mogućnosti stvaranja terapeutika koji bi mogli ostvarivati više funkcija u ovisnosti o njihovoj koncentraciji i uvjetima (Jeffery, 2015).

5.1 Duplikacija gena

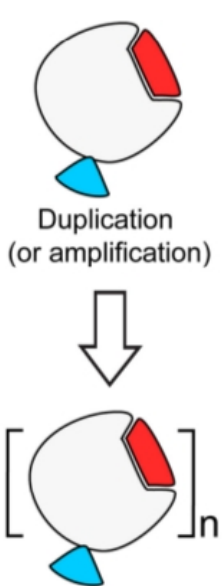
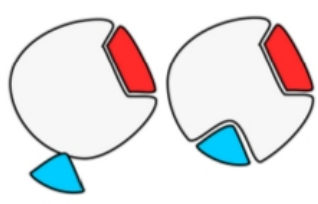
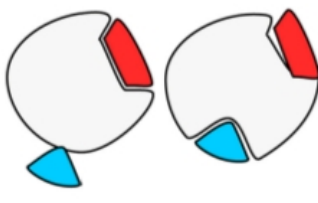
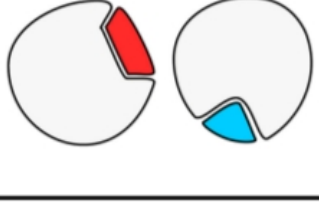
Pretpostavlja se da su MP evoluirali tijekom mutacija sekvenci što može primarno dovesti do neutralnih inovacija, a kasnije i do novih biokemijskih pogodnosti. Međutim, nije jasno kako je došlo do toga s obzirom da mogu nastati mutacije koje dovode do gubitka funkcije (eng. *loss-of-function*), čime bi se izgubila prvotna funkcija. Da bi MP nastali potrebno je napraviti kompromis između prvotne i novonastajuće funkcije. Iz tog razloga se pretpostavlja da proteini s većom fleksibilnošću imaju veću mogućnost za nakupljanje mutacija bez deletirajućeg učinka. Također su moguće mutacije u cis-djelujućim elementima i trans-djelujućim faktorima, što znači da je dovoljna promjena u regulatornoj regiji za postizanje dviju funkcija, ovisno o vremenskoj i prostornoj ekspresiji. Predlaže se da duplikacije osim što mogu utjecati na divergenciju i posljedično gubljenje funkcija, također mogu sudjelovati u porijeklu i očuvanju multifunkcionalnih proteina. Generalno duplikacije gena pogoduju održavanju biološkog sustava i služe kao sustav podrške (Espinosa-Cantú i sur., 2015).

Predloženi su modeli kojima bi se objasnili evolucijski ishodi duplikacije gena. Neofunkcionalizam je klasični model divergencije gdje jedan gen zadržava naslijeđenu funkciju dok

njegov paralog nakuplja mutacije višom frekvencijom i ponekad se fiksira u populaciju. Subfunkcionalizam predlaže da nakon duplikacije gena i divergencije dolazi do razdvajanja biološke i molekularne funkcije među paralogima. Subfunkcionalizam se koristi u dva različita modela. U modelu "*escape from adaptive conflict*" adaptivna evolucija dovodi do kvalitativne subfunkcionalizacije molekularnih funkcija koje postižu kompromis tako da nakupljanjem mutacija ne dolazi do promjena unutar početnog naslijeđenog gena. Svaki paralog može evoluirati kako bi optimizirao novodobivenu funkciju. Kvantitativna subfunkcionalizacija se događa kada neutralna evolucija rezultira mutacijama kojima se gube funkcije između paraloga te oba duplikata postaju neophodna za održavanje naslijeđene funkcije. Model "*gene-dosage amplification*" predlaže da genski par može ostati u duplikatu i da su oba nužna zbog održavanja doze naslijeđene funkcije.

Duplikacije gena omogućavaju inovacije jer nema selektivnog pritiska. Omogućuje se zadržavanje funkcije u paraloga u slučaju da dođe do mutacija koje dovode do gubitka funkcije. Predloženo je da se naslijeđena funkcija zadržava ili putem modela "*gene-dosage amplification*" ili preko nepotpune subfunkcionalizacije. Nepotpuna subfunkcionalizacija je fenomen kada dolazi do funkcionalnog preklapanja između paraloga, i može djelovati na neutralni drift i adaptivnu evoluciju. Stoga se predlaže da se nove funkcije stječu jednim ili oboma modelima.

Održavanje funkcije MP-a se u većini slučajeva zadržava kao u proteinima Hxk1/Hxk2, Lys20/Lys21, ENO1/ENO2. Pokazano je da se uslijed mutacija u jednom od paraloga drugi aktivira i obnaša funkcije MP-a. Eksperimentima je pokazano da imaju sadržane prvotne funkcije, a paralozi se često razlikuju u ekspresiji i regulaciji. Očekuje se da se naslijeđena funkcija zadržava ili putem modela "*gene-dosage amplification*" ili preko nepotpune subfunkcionalizacije. Pretpostavlja se da su to glavni modeli kojima se postiže i zadržava funkcija MP-a (sl. 1) (Espinosa-Cantú i sur., 2015). Kako bismo dobili bolji uvid u porijeklo i nastanak MP-a potrebno je dodatno istraživati kako dolazi do evolucije novih funkcija u MP-a. Duplikacija gena ne mora nužno biti jedini fenomen nastanka MP-a, veliki udio mogu imati točkaste mutacije, i evolucijske sile poput genetičkog drifta.

 Duplication (or amplification)	Scenario	Outcome	Implications
	I. Dosage selection leads to the origin or maintenance of moonlighting activities		<ul style="list-style-type: none"> • Common in genes with low tradeoffs between coexistent functions • Leads to paralogs with a high degree of functional overlap • Moonlighting behaviors are volatile
	II. Partial subfunctionalization leads to the origin or maintenance of moonlighting activities		<ul style="list-style-type: none"> • Tradeoffs between the two functions are tolerated and "resolved" • Leads to paralogs with some degree of functional overlap • Moonlighting behaviors are stable
	III. Complete subfunctionalization leads to the loss of moonlighting		<ul style="list-style-type: none"> • Tradeoffs are resolved for both functions • Leads to specialized paralogs with no functional overlap • Moonlighting behaviors are lost

Slika 1. Mogući mehanizmi evolucije *moonlighting* proteina nakon duplikacije gena. Različiti mehanizmi evolucije gena utječu na porijeklo, zadržavanje i gubljenje *moonlighting* proteina. (1) Duplikacija gena može omogućiti porijeklo i zadržavanje *moonlighting* proteina selekcijom dozne amplifikacije jedne ili više naslijeđenih funkcija. (2) Nepotpuna subfunkcionalizacija jedne ili više naslijeđenih funkcija omogućava porijeklo i zadržavanje *moonlighting* svojstava kao rezultat neutralne evolucije. (3) Duplikacija gena može uzrokovati gubitak *moonlighting* svojstava u jednom od paraloga ili u oba genska produkta uslijed specijacije molekularnih funkcija. Preuzeto iz: "*Gene duplication and the evolution of moonlighting proteins*", Espinosa-Cantú i sur., 2015.

6. ZAKLJUČAK

MP su relativno novootkriveni proteini o kojima se još uvijek ne zna dovoljno. Nalaze se u velikom broju vrsta i s različitim brojem funkcija. Za bolje razumijevanje i pronalaženje novih MP-a, a tako i MPCS-a potrebno je bolje razumjeti njihovu evoluciju i samo porijeklo.

Izuzev samog porijekla i nastanka, još uvijek ne znamo mehanizme transporta i izlučivanja MPCS-a. Kako ne sadrže signalne N-terminalne sekvence, otvaraju se mogućnosti novim neotkrivenim mehanizmima transporta gdje je važno da za prvotnu funkciju većina proteina ostaje unutar stanice. S obzirom da MPCS-ovi daju velike mogućnosti bakterijama u infekcijama i virulentnosti, razumijevanje interakcija između MPCS-a i drugih proteina moglo bi bitno promijeniti ciljne proteine u liječenju bolesti. Tako je utvrđeno da MPCS-ovi kao receptori za plazminogen omogućuju bakteriji invaziju i migraciju kroz tkiva. Za razumijevanje porijekla, evolucije ili budućih načina ciljanja proteina, moramo razumjeti njihova fizikalna svojstva. Kao što je do sada pokazano MPCS-ovi se ne razlikuju od citosolnih proteina. Zamijećeno je da postoji razlika u duljini aminokiselinskog slijeda što omogućuje veću stabilnost, pa su posljedično duži proteini ciljani za evoluciju u MPCS-ove. Još jedna od karakteristika su IDR-ovi za koje se pretpostavlja da su moguća mjesta evoluiranja novih funkcija. IDR-ovi su nađeni kod MP-a, ali ne kod MPCS-a. Buduća istraživanja će pokazati jesu li IDR-ovi karakteristika samo unutarstaničnih MP-ova ili postoje MPCS-ovi s IDR-ovima.

MPCS-ovi i dalje ostaju misterij s obzirom da ne dijele karakteristike izvanstaničnih proteina, a izvršavaju funkcije na površini stanice. Očito je da su budućnost i nova saznanja u bioinformatici i za daljnji napredak je potrebno raditi sveobuhvatna istraživanja sa što više podataka uz programe koji predviđaju multifunkcionalne proteine. Iako je još puno pitanja nerazriješeno uz MPCS-ove, napretkom tehnologije i bioinformatike, moguće je da ćemo otkriti još mnogo više MPCS-a.

7. LITERATURA

- Amblee V., Jeffery C. J., (2015) Physical features of intracellular proteins that moonlight on the cell surface. *Public Library of Science one*. 10(6): e0130575. doi:10.1371/journal.pone.0130575
- Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D., *Imunologija*, sedmo izdanje, Medicinska naklada (2010), str. 114-121
- Espinosa-Cantú A., Ascencio D., Barona-Gómez F. and DeLuna A., (2015) Gene duplication and the evolution of moonlighting proteins. *Frontiers in Genetics*. 6:227. doi:10.3389/fgene.2015.00227
- Jeffery, C. J., (2015) Why study moonlighting proteins? *Frontiers in Genetics*. 6:211. doi:10.3389/fgene.2015.00211
- Jeffery, C. J., (2014) An introduction to protein moonlighting. *Biochemical Society Transactions*. 42, 1679–1683; doi:10.1042/BST20140226
- Jeffery, C. J., (2009) Moonlighting proteins—an update. *Molecular BioSystems*. 5, 345–350; doi:10.1039/B900658N
- Jeffery, C.J., (1999) Moonlighting proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 24, 8-11, Review. PubMed; PMID: 10087914
- Lehninger, A., Nelson D. L., Cox, M. M., *Lehninger's principles of biochemistry* 6e , W. H. Freeman and Company (2013), pp. 642-643
- Khan, K.I., Kihara D., (2016) Genome-scale prediction of moonlighting proteins using diverse protein association information. *Bioinformatics*. 32(15):2281-8. doi:10.1093/bioinformatics/btw166
- Piatigorsky J., Wistow G., (1989) Enzyme/crystallins: gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell*. 57: 197–9. PMID: 2649248
- Piatigorsky J., Wistow G., (1987) Recruitment of enzymes as lens structural proteins. *Science*. 236: 1554–6. PMID: 3589669

8. SAŽETAK

Moonlighting proteini obuhvaćaju set multifunkcionalnih proteina koji izvršavaju dvije ili više biokemijskih funkcija, a nisu nastali genskim fuzijama, alternativnim prekrajanjima, proteolitičkim fragmentima ili su promiskuitetni enzimi. *Moonlighting* proteini sa sekundarnom funkcijom na staničnoj membrani su vrlo često nađeni slučajno tijekom proteomskih istraživanja. S obzirom da raste broj novootkrivenih MPCS-a istražene su, njihove primarne i sekundarne funkcije, razlike s obzirom na unutarstanične proteine i eventualne sličnosti s izvanstaničnim proteinima. Iako su neki mehanizmi funkcija razrađeniji kao u receptora za plazminogen, još puno MPCS-a ima nepoznate ili dovoljno nerazjašnjene funkcije. Uz napredak bioinformatike, omogućena je brža i preciznija identifikacija MPCS-a, što bi moglo dovesti do nalaženja većeg broja MPCS-a, i do razumijevanja njihove evolucije. Jedna od pretpostavka je da su nastali duplikacijom gena, ali to ne mora biti jednoznačno rješenje. Daljnja opsežna i sustavna istraživanja omogućit će razumijevanje evolucije i svojstava MPCS-a.

9. SUMMARY

Moonlighting proteins comprise a subset of multifunctional proteins that perform two or more biochemical functions, that are not due to gene fusion, alternative splicing, proteolytic fragments or promiscuous enzymes activities. Intracellular proteins that moonlight on the cell surface have been identified by chance in proteomic researches. The number of new MPCSSs is growing, and therefore their primary and secondary functions, differences with intracellular proteins, and possible similarities with extracellular proteins were investigated. Although we know some mechanism more elaborate, as the receptor for plasminogen, many of MPCSSs has unknown or unexplained functions. The bioinformatics progresses allow faster and precise identification of the MPCSSs, which could lead to discovery of a larger number of MPCSSs, and to understanding of their evolution. One hypothesis is that gene duplication may have a role in the origin of the MPCSSs, but it does not have to be the only explanation. Extensive and systematic experiments will allow better understanding of the evolution and the features of MPCSSs.